



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Fosfodiesterases como alvo terapêutico em *Plasmodium falciparum*: caracterização da atividade anti malária de novos compostos

Cátia Lagartinho do Nascimento

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE
TROPICAL EM ESPECIALIDADE DE SAÚDE TROPICAL**

(ABRIL , 2017)



Fosfodiesterases como alvo terapêutico em *Plasmodium falciparum*: caracterização da atividade anti malária de novos compostos

Cátia Lagartinho do Nascimento

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical

Orientação: Investigadora Doutora Fátima Nogueira do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

(ABRIL , 2017)

“As pessoas tornam-se verdadeiramente notáveis quando começam a pensar que conseguem fazer coisas. É quando acreditam nelas mesmas que descobrem o primeiro segredo para o sucesso.”

- Norman Vincent Peale

Ao André, pelo sorriso que provoca em mim

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu pai que me iluminaram este caminho, sem nunca o exigir ou forçar, tornando-o possível. À minha irmã por todo o apoio e confiança demonstrados. Pelas palavras de inspiração quando mais precisei.

À minha orientadora, investigadora doutora Fátima Nogueira pela confiança, determinação e transmissão dos seus conhecimentos. Por toda a ajuda e dedicação. Um modelo na carreira científica. Pela preocupação e compreensão demonstradas ao longo de toda esta etapa.

Ao André, o melhor parceiro que alguém pode ter. O meu braço direito. Obrigada por estares sempre presente, sem nunca duvidar de mim ou questionar as minhas escolhas.

Aos meus avós cuja sabedoria, cultura e educação fazem de mim quem sou hoje.

A toda a família Lavado Almeida por serem simplesmente excecionais. Desde as palavras mais doces da D. Helena às ideias mirabolantes do Sr. Manel. Marta um obrigada pelo brilho no teu olhar quando falamos do meu futuro. Pi, pelas gargalhadas e jantares. Mariana, pela amizade indescritível que temos e pelos momentos de lazer juntas que permitiram agilizar todo este processo.

Ao Pedro Eduardo por ser tão ele e uma motivação para mim. Por todas as tuas surpresas nos momentos-chave.

À Maria pela vivência de sempre. Por passarmos pelo mesmo e nos compreendermos melhor que ninguém. Pelas tardes de trabalho juntas e as noites de convívio.

À Diana. Por seres a minha pessoa, uma irmã de sangue diferente.

Ao Nuno e à Telma por tornarem os meus dias melhores.

Às Joanas, Tiago e Lis pela ajuda e companheirismo.

RESUMO

A malária é a doença parasitária que mais mortes provoca mundialmente. Causada por cinco espécies distintas do género *Plasmodium* (*falciparum*, *ovale*, *vivax*, *malariae* e *knowlesi*) é transmitida ao ser humano pela picada do mosquito fêmea *Anopheles spp.* Pode ser classificada em duas categorias: malária grave e não grave, sendo o *P. falciparum* a espécie mais letal. Todos os anos, biliões de pessoas encontram-se em risco de contrair a doença, sendo na região subsaariana do continente africano que sobressai anualmente o número de casos e mortes, principalmente em crianças com idade inferior a cinco anos. As resistências aos fármacos anti maláricos em uso bem como a inexistência de uma vacina eficaz são o principal obstáculo no combate à doença. A rápida disseminação das resistências torna crucial a pesquisa e síntese de novos compostos com ação anti malárica, capazes de atuar nos diversos estádios do desenvolvimento do parasita.

Neste trabalho, procedeu-se à avaliação da suscetibilidade *in vitro* de uma biblioteca de compostos sintetizados, com estrutura pirroloquinolona, que têm como alvo terapêutico as fosfodiesterases parasitárias, importantes biologicamente para o *Plasmodium falciparum* em diferentes etapas do seu desenvolvimento.

Para a análise da sua atividade anti malárica, calculou-se o valor de IC₅₀ em culturas de *P. falciparum* e avaliou-se o risco de possível existência de resistência pelo método do inóculo mínimo para resistência – MIR.

Os compostos de pirroloquinolonas demonstram eficácia na inibição do crescimento do parasita *in vitro*, com resultados mais promissores que alguns dos fármacos anti maláricos atualmente em uso. O risco de existência de resistência para este grupo de compostos é baixo, o que torna essencial a realização de estudos posteriores.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium falciparum*, resistências, anti maláricos, suscetibilidade *in vitro*, pirroloquinolonas, fosfodiesterases, IC₅₀, MIR.

ABSTRACT

Malaria is the parasitic disease that more deaths causes globally. Caused by five different species from the *Plasmodium* genus (*falciparum*, *ovale*, *vivax*, *malariae* and *knowlesi*) is transmitted to humans by the bite of the female mosquito *Anopheles spp.* It can be classified in two categories: severe malaria and non-severe, being *Plasmodium falciparum* the more lethal specie. Every year, billions of people find themselves at risk of contract the disease, being the sub-Saharan region of the African continent that stands out annually in number of cases and deaths, mainly in children under the age of five. The resistance to antimalarial drugs at current use as well as the inexistence of an effective vaccine are the main obstacle fighting the disease. The quick spread of resistances makes crucial the research and synthesis of new antimalarial compounds, capable to act at every stages of parasite development.

At this work, proceeded the evaluation of *in vitro* susceptibility of a synthesized compound library, pyrroloquinolones scaffolds, with parasitic phosphodiesterases as therapeutic targets, biologically important in different stages of *Plasmodium falciparum* development.

To analyze their antimalarial activity, IC₅₀ was calculated at *P. falciparum* cultures and the risk of resistance was evaluated using the *minimum inoculum for resistance* method – MIR.

Pyrroloquinolone scaffolds are effective inhibiting parasite growth *in vitro*, with promising results, better than some of the current antimalarial drugs at use. The risk of resistance is low for this group of compounds, becoming essential further studies.

Key-words: malaria, *Plasmodium falciparum*, resistances, antimalarial, *in vitro* susceptibility, pyrroloquinolone scaffolds, phosphodiesterases, IC₅₀, MIR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i>	4
Figura I-2 - Áreas de transmissão da Malária e resistências reportadas do <i>Plasmodium falciparum</i>	12
Figura I-3 - Prevalência de mutações no <i>K13</i> no sudeste asiático.....	13
Figura III-1 - Ensaio para determinação de IC ₅₀ pelo método de SYBR Green I.....	24
Figura III-2 - Determinação do risco de frequência de resistência pelo método MIR.....	25
Figura IV – Valores de concentração inibitória para <i>Plasmodium falciparum</i>	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Principais fármacos anti-maláricos disponíveis	7
Tabela II - Atividade anti malárica <i>in vitro</i> dos compostos em estudo contra estirpes sensível e resistente de <i>P. falciparum</i>	29
Tabela III - Determinação do MIR.....	36

ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

ACTs – terapias combinadas à base de artemisinina

ARMD – *accelerated resistance to multiple drugs* (resistência acelerada a múltiplos fármacos)

AS – artesunato e sulfadoxina

ASMQ – artesunato e mefloquina

cAMP – adenosina monofosfato cíclica

cGMP – adenosina monofosfato cíclica

CQ – cloroquina

DMSO - *dimethyl sulfoxide*

IC₅₀ – metade da concentração inibitória máxima

IPTi – terapêutica preventiva intermitente em crianças

IPTp – terapêutica preventiva intermitente em grávidas

MQ - mefloquina

MIR – inóculo mínimo para resistência

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDEs – fosfodiesterases

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. vivax – *Plasmodium vivax*

RBC – *red blood cells*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SIG – SYBR Green I

SP – sulfadoxina e pirimetamina

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
I-INTRODUÇÃO	1
1. Malária.....	2
1.1. Ciclo biológico do parasita	3
1.2. Diagnóstico Clínico e Laboratorial	5
1.3. Estratégias de Prevenção e Controlo	5
1.4. Anti maláricos disponíveis	7
2. Resistências aos anti maláricos	11
3. Avaliação do potencial anti malárico de novos compostos <i>in vitro</i>	14
4. Fosfodiesterases.....	16
II- OBJETIVOS.....	18
1. Objetivo Geral	19
2. Objetivos Específicos	19
III- MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Soluções e Meios de Cultura	21
1.1. Meio de cultura RPMIc	21
1.2. Solução PBS (Phosphate Buffered Saline).....	21
1.3. Solução de Sorbitol a 5%	21
1.4. Solução Corante Giemsa a 20%	21
1.5. Compostos MS	21
1.6. Cloroquina	21
1.7. Solução de eritrócitos humanos não parasitados a 50%	21
1.8. Solução de SYBRGreen I.....	22
2. Culturas de <i>Plasmodium falciparum</i>	22
2.1. Estirpes de <i>P. falciparum</i>	22

2.2. Manutenção das culturas	22
2.3. Monitorização das culturas.....	22
2.4. Sincronização das culturas.....	22
3. Avaliação do potencial anti malárico dos novos compostos in vitro	23
3.1. Determinação do IC ₅₀	23
3.2. Avaliação do risco de seleção de parasitas resistentes usando o MIR.	25
IV-RESULTADOS/DISCUSSÃO	26
1. Atividade anti malárica <i>in vitro</i> dos compostos nas estirpes 3D7 e Dd2 de <i>Plasmodium falciparum</i>	27
1.1. Determinação do IC ₅₀ dos compostos	27
2. Avaliação do risco de desenvolvimento de resistência	35
2.1. Determinação do inóculo mínimo para avaliar resistência (MIR) na estirpe Dd2 de <i>Plasmodium falciparum</i>	35
V- CONCLUSÃO	37
VI-BIBLIOGRAFIA	39
VII-ANEXOS.....	47

I-INTRODUÇÃO

1. Malária

No ser humano, a malária é causada por cinco espécies do parasita do género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. knwolesi*. A transmissão do parasita é feita pela picada do mosquito fêmea *Anopheles spp.*(1). O *Plasmodium* é um parasita eucariota unicelular pertencente à Família Plasmodiidae, Ordem Haemosporida, Classe Haematozoae e Filo Apicomplexa (2,3).

O conjunto de sinais e sintomas num quadro clínico de malária estão presentes na fase eritrocitária do desenvolvimento parasitário (os sintomas surgem entre sete a cerca de 30 dias após a picada). A doença pode ser dividida em duas categorias: malária severa e não severa (4). A última apresenta sintomas idênticos a uma gripe incluindo febre, vômitos dores musculares, diarreia podendo causar também anemia. Na malária severa observa-se o comprometimento de órgãos vitais e/ou a disfunção metabólica bem como anomalias a nível sanguíneo (hemólise intravascular, anemia grave), acidose metabólica, falência renal aguda, hepatomegalia, esplenomegalia, comprometimento do sistema nervoso central com alteração do estado de consciência e coma. (5). A espécie de parasita responsável pela malária grave é o *P. falciparum* nomeadamente a forma mais grave, a malária cerebral. Os grupos de maior risco são as crianças e as grávidas, que pela presença de um sistema imunitário mais debilitado, apresentam consequências mais graves após infeção (6,7).

Anualmente tem vindo a observar-se uma redução significativa do número de casos de malária bem como do número de mortes devidas a malária. Desde o ano de 2010 o número estimado de casos baixou de 245 milhões para 212 milhões (14%) em 2015 e o número de mortes estimadas em 2010 sofreu uma redução de 22% de 554 000 para 429 000, no ano de 2015. O continente africano é a região onde ocorre maior número de casos e mortes apresentando 191 milhões de casos e 394 000 mortes no ano de 2015 (valores estimados) (8).

1.1. Ciclo biológico do parasita

O *Plasmodium spp.* é um organismo eucariota que mantém o seu ciclo de vida entre dois hospedeiros: um organismo vertebrado (hospedeiro intermediário) e o mosquito *Anopheles spp.* fêmea (hospedeiro definitivo). Após a picada do mosquito, os esporozoítos presentes nas suas glândulas salivares, entram na circulação sanguínea do hospedeiro intermediário (fase assexuada) e vão alojar-se no fígado. Esta fase é conhecida como exo-eritrocitária e é crucial para a replicação parasitária (1).

No período em que os esporozoítos estão no fígado estes invadem os hepatócitos e multiplicam-se assexuadamente (esquizogonia hepática) originando merozoítos até alcançarem de novo a corrente sanguínea. Alguns merozoítos têm a capacidade de permanecer no fígado em fase latente (hipnozoítos), sendo os responsáveis por fenómenos de recrudescência, característicos apenas de infeções por *Plasmodium vivax e ovale*. Na corrente sanguínea, os merozoítos infetam os glóbulos vermelhos (fase eritrocitária) e dentro destes assumem a forma jovem de anel, trofozoíto e evoluem para esquizontes (contêm merozoítos) que ao rebentarem o glóbulo vermelho vão permitir a infeção de outros eritrócitos (Figura I) (5,9).

Em apenas poucos dias, a parasitémia aumenta exponencialmente, comprometendo o estado de saúde e é nesta fase eritrocitária que se manifestam os sintomas da doença. Numa infeção por *Plasmodium spp.*, os sintomas surgem sete ou mais dias após a picada infetante. Alguns merozoítos podem desenvolver-se em gametócitos (forma infetante para o mosquito). Deste modo, o ser humano infetado ao ser picado, torna-se infetante para o mosquito permitindo a evolução para a fase sexuada do parasita, na qual os gametócitos (masculinos e femininos) ao alcançar o intestino médio formam o zigoto (em que ocorre meiose) que posteriormente se aloja na parede intestinal, formando o oocisto (9). O desenvolvimento em esporozoítos ocorre por multiplicação esporogónica. Os esporozoítos são libertados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares, iniciando de novo o ciclo (10).

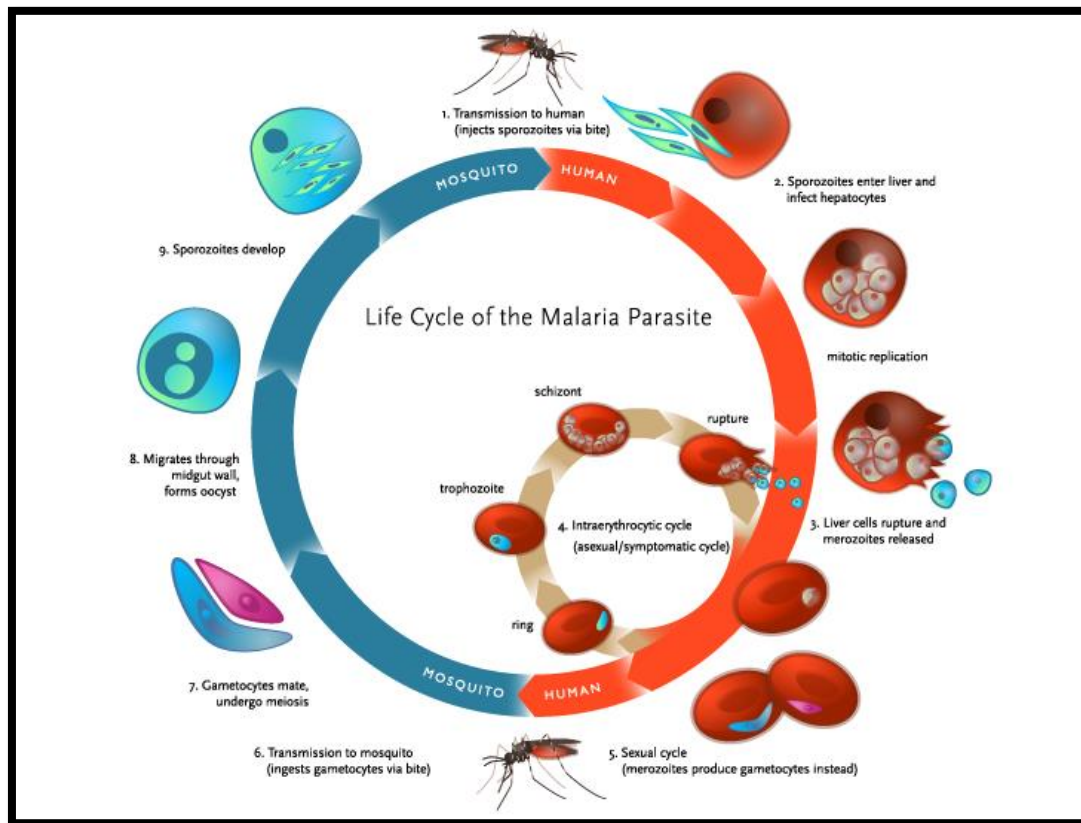


Figura I-1: Ciclo de vida do parasita da malária. 1-Transmissão ao ser humano (esporozoítos injetados via picada). 2- Entrada dos esporozoítos no fígado e infecção dos hepatócitos (replicação mitótica). 3- Rutura das células do fígado e libertação de merozoítos. 4- Ciclo intra-eritrocitário (assexuado/ciclo sintomático) 5- Ciclo sexual (os merozoítos produzem gametócitos). 6- Transmissão ao mosquito (ingestão de gametócitos via picada). 7- Gametócitos passam pelo processo meiótico. 8- Gametócitos migram para a parede do intestino médio e formam oocistos. 9- Desenvolvimento em esporozoítos (adaptado de (11)).

1.2. Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico laboratorial deve ser sempre realizado quando há suspeita de doença por malária. Este pode ser efetuado com recurso a microscopia ou a testes rápidos de diagnóstico. Como boa prática, o tratamento deve ser iniciado só após a confirmação do diagnóstico laboratorial, o que traz vantagens ao simples diagnóstico presuntivo, permitindo uma terapêutica mais fiável, mais dirigida e adequada com a possível monitorização da mesma (11).

Aquando a presença de febre e restante sintomatologia já referida num paciente em zona endémica, ou com história de recente estadia na mesma, o diagnóstico laboratorial surge com a finalidade da pesquisa do parasita direta ou indiretamente. A utilização de testes rápidos de diagnóstico (método indireto) permite rastreios à população residente em zona endémica, geralmente países de baixa renda, com tempo útil de resposta favorável (12).

Sempre que possível, a microscopia ótica deve ser realizada com o objetivo de identificar a presença do parasita em gota espessa (método direto) e identificação da espécie infetante pela realização de esfregaço. Contudo, pode apresentar desvantagens uma vez que a distinção morfológica exige disponibilidade de pessoal treinado e em parasitémias baixas (< 10 parasitas/ μL) a deteção é quase nula, o que se traduz muitas vezes em diagnósticos errados e muitas vezes inconclusivos aquando a monitorização da terapêutica (13).

A PCR (*polymerase chain reaction*) pode contribuir para estudos epidemiológicos e para o combate ao desafio de diagnóstico em parasitémias baixas (14). É o método mais específico e sensível uma vez que permite a amplificação do ADN parasitário mas de difícil implementação em países de baixa renda pelos custos de aquisição, manutenção e especialização dos profissionais (15). O tempo útil de resposta alargado é muitas vezes o entrave para a sua utilização, principalmente nos casos mais graves (16).

1.3. Estratégias de Prevenção e Controlo

O controlo do número de casos e mortes por malária tem assentado no controlo do vector, na quimio-prevenção e na possível utilização de vacinação.

Para o controlo do vector, têm sido implementadas diferentes estratégias como a utilização de sprays inseticidas no interior das habitações e a distribuição em massa de redes mosquiteiras. Contudo, têm sido reportadas resistências aos inseticidas, o que põe em causa a estratégia de combate atualmente empregue (8).

A utilização de terapêutica preventiva intermitente nas grávidas (IPTp) tem diminuído a mortalidade perinatal, a anemia materna e o baixo peso dos recém-nascidos, principalmente na região subsaariana. Estudos realizados com a mesma metodologia em crianças (IPTi) referem a prevenção contra a malária clínica e a anemia contudo, até à data, nenhum país refere a implementação desta política (17).

Atualmente a vacinação ainda não é por si só eficaz para a prevenção desta doença. Só uma vacina completou os testes de Fase 3 e alguns projetos mantêm-se em estudo (18).

Não obstante todos os esforços realizados, os estudos epidemiológicos não têm sido suficientes para a avaliação da eficácia das medidas empregues no controlo da Malária, sendo notável a necessidade de investimento nesta área (19).

1.4. Anti maláricos disponíveis

Os fármacos anti maláricos têm como objetivo principal a diminuição da morbidade e mortalidade devido à malária através da eliminação do parasita. Em termos de saúde pública, pretende-se ainda diminuir a sua transmissibilidade, limitar os reservatórios humanos dos parasitas e prevenir o aparecimento e dispersão de resistência aos anti maláricos (20). Atualmente existem várias terapias farmacológicas eficazes, a maioria das quais visam o parasita da malária durante seu ciclo replicativo dentro dos eritrócitos humanos, o estadio do ciclo de vida que está associado com as manifestações clínicas da malária (21). Na profilaxia e tratamento da malária, os grupos de compostos com maior expressão são os fármacos antagonistas da síntese do ácido fólico (ex. pirimetamina e sulfadoxina), os derivados do Quinghaosu (ex. artemisinina) e os fármacos antimaláricos da classe das quinolinas (ex. quinino, mefloquina, cloroquina e primaquina) (22,23). As opções terapêuticas contra a malária com maior relevância resumem-se a nove famílias de fármacos apresentadas na Tabela I.

Tabela I - Principais fármacos anti maláricos disponíveis (adaptado de (20)).

Família Química	Fármacos
4-aminoquinolinas	cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Aminoálcoois	quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas e sulfonas	sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidas	proguanil, cloroproguanil
Diaminopirimidina	pirimetamina
8-aminoquinolinas	primaquina
Lactonas sesquiterpênicas	artemisinina, arteeter, artemeter, artesunato, dihidroartemisinina
Antibióticos	azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina
Naftoquinonas	atovaquona

Para tratamento preventivo intermitente em crianças e grávidas (a partir do primeiro trimestre), a OMS recomenda a utilização de sulfadoxina-pirimetamina em zonas de transmissão moderada e elevada (11). Para o tratamento de casos de malária não

complicada, e a partir de 2006 a OMS passou a recomendar a utilização de terapia combinada com um derivado da artemisinina (ACT). Atualmente é a classe terapêutica mais comumente utilizada em todo o mundo, tendo sido adotados como tratamento de primeira linha em quase todos os países onde *P. falciparum* é endêmico (11).

Nas últimas décadas, o controle e tratamento da malária têm sido bastante dificultados pelo surgimento e disseminação da resistência nomeadamente de *P. falciparum* aos anti maláricos que sucessivamente têm sido introduzidos no mercado (cloroquina, sulfadoxina e pirimetamina, mefloquina) incluindo a última linha terapêutica disponível, os ACTs (24).

O primeiro fármaco para o qual foram confirmados casos de falência terapêutica devida a resistência foi a cloroquina no final da década de 1950. Tendo-se verificado simultaneamente na fronteira entre Tailândia e Camboja, e na Colômbia, determinada por uma emergência independente de mutantes nestas duas regiões. Posteriormente, a dispersão destes mutantes resistentes foi rápida, as estirpes asiáticas chegaram a África Oriental em 1978, e em 1989 a resistência à cloroquina já estava presente em todo o continente (25). Atualmente, estudos da eficácia da cloroquina revelam que este fármaco é apenas eficaz na América central, apresentando taxas de falência terapêutica entre os 10 e 100% no continente africano.

O mecanismo de resistência à cloroquina está relacionado com mutações nos genes *Pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1) e *Pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) (26). A cloroquina atua no vacúolo digestivo do parasita, impedindo a polimerização dos grupos heme resultantes da degradação da hemoglobina. A alteração das proteínas codificadas pelos genes *pfcr1* e *pfmdr1* reflete-se nos níveis de acumulação da cloroquina no vacúolo digestivo. Desta forma, permite ao parasita sobreviver na presença do fármaco. Nos anos 60 e 70 as estirpes resistentes à cloroquina rapidamente se espalharam pela América do Sul, Índia, sudeste asiático e continente africano (25,27). A Amodiaquina mostrou-se um potente substituto do SP e da Cloroquina. A sua eficácia é superior à SP, reduzida, no entanto, em locais onde a resistência à Cloroquina se mantém elevada (28).

A resistência à sulfadoxina-pirimetamina foi inicialmente reportada na fronteira entre a Tailândia e o Camboja em meados da década de 1960, tendo-se estendido até ao continente africano (com início na África Oriental e posterior dispersão para o resto do

continente) em finais dos anos 80 (29). Esta combinação é considerada atualmente uma monoterapia devido ao mecanismo de ação na mesma via metabólica dos dois fármacos (antifolatos). As taxas de falência reportadas para este tratamento são elevadas no continente africano (18.7-52.8%), onde o fármaco foi extensivamente utilizado para o tratamento da malária resistente à cloroquina e onde se verificou uma rápida emergência de resistências em 1-2 anos. A eficácia da combinação com artesunato (AS-SP) correlaciona-se com a eficácia de SP. Apesar de existir uma ligeira redução na resistência reportada aos antifolatos, a resistência cruzada com o cotrimoxazol e o facto de existir circulação extraoficial de SP em monoterapia em muitos países tem mantido a pressão seletiva do fármaco. Atualmente, a SP é utilizada, em muitos países, no tratamento preventivo intermitente da grávida e, também por vezes, em crianças, sendo aceite que continua a ser efetivo em casos de resistência moderada (17,20).

A mefloquina surge como fármaco profilático e alternativa terapêutica em regiões onde a malária resistente a CQ e SP estava disseminada. Os primeiros casos de resistência a este fármaco foram registados no final da década de 80 mais uma vez na fronteira do Camboja e Tailândia (30) disseminou-se para o Vietnam e posteriormente para o continente africano. No Sudeste Asiático, a existência de parasitas resistentes foi demonstrada mediante estudos com recurso a marcadores moleculares (amplificação do gene *pfmdr1*), o que estaria associado à falência terapêutica (31). Na área do Sudeste Asiático, onde ASMQ é usada ainda como tratamento em algumas regiões, a resistência à mefloquina encontra-se disseminada (32).

A utilização de atovaquona-proguanil é atualmente principalmente limitada à profilaxia em viajantes devido ao seu elevado preço. Mutações únicas no *citocromo b* (*pfcytb*) estão associadas a uma menor eficácia do fármaco e têm sido descritas em casos de falência terapêutica em numerosos países africanos (33,34).

A artemisinina (produto natural extraído da planta *Artemisia annua*) e seus derivados atuam de forma rápida na depuração dos parasitas no entanto, sofrem também rápida metabolização e eliminação (semivida $\pm 3h$). Atuam contra todos os estadios no ciclo da malária, incluindo os trofozoítos, anéis e gametócitos (menos eficaz contra estes últimos) (35).

Os ACTs associam um fármaco potente e de ação rápida (derivado da artemisinina) com um fármaco de ação mais lenta mas com semivida mais prolongada (ex: lumefantrina,

amodiaquina, piperaquina). O primeiro é responsável pela eliminação da maior parte dos parasitas em circulação e o segundo elimina os parasitas residuais, atuando por mecanismos de ação diferentes, de modo a evitar o aparecimento de resistências (36). A resistência aos componentes dos ACTs observada atualmente no Sudeste Asiático, caracteriza-se pela depuração mais lenta dos parasitas e algumas recrudescências (37,38). A identificação de polimorfismos no gene *pfK13* que codifica a proteína *kelch* K13 permitiu estabelecer a associação entre mutações e a resistência às artemisininas por parte de *P. falciparum* (39).

A frequência de alelos mutantes no *pfK13* e a ocorrência de resistência às artemisininas é coincidente, permitindo estabelecer um marcador molecular de resistência aos derivados da artemisinina (39). Atualmente não existem alternativas viáveis aos ACTs.

Os antibióticos mais utilizados para o tratamento de malária, são a doxiciclina, azitromicina e clindamicina. Estes têm como alvo o apicoplasto (40,41), um organelo derivado de um plastídio, com provável origem num evento endossimbiótico secundário, possui importantes funções metabólicas e de homeostasia, incluindo a biossíntese de ácidos gordos e heme (42,43). Devido à sua indispensabilidade para a sobrevivência do parasita, representa um alvo promissor para o uso de antibióticos como anti maláricos.

O designado *delayed death effect* ou efeito de morte retardada, é típico em antibióticos que inibem a tradução procariótica, como o caso da azitromicina, clindamicina, tetraciclina ou doxiciclina (40,44,45,46). Os antibióticos inibem a tradução no apicoplasto durante o 1º ciclo de replicação, resultando na destruição do apicoplasto dos merozoítos filhos no 2º ciclo de replicação. Desta forma impedem o desenvolvimento até esquizonte (47).

Os macrólidos e tetraciclina têm sido amplamente estudados nos últimos anos, no entanto outros antibióticos demonstram-se eficazes contra infecções por *Plasmodium spp.* como por exemplo as quinolonas (48). A primeira quinolona descoberta (ácido nalidíxico) surgiu como co-produto na síntese de cloroquina (49). A maior classe de quinolonas empregues como anti bacterianos são as fluoroquinolonas, que *in vitro* não sugerem ser uma classe promissora contra o género *Plasmodium spp.*

2. Resistências aos anti maláricos

A seleção de parasitas resistentes aos anti maláricos desenvolve-se em duas fases: na primeira fase, um evento espontâneo e ao acaso provoca uma mutação que confere resistência a um fármaco, oferecendo ao parasita uma vantagem de sobrevivência; numa segunda fase, os parasitas resistentes são selecionados pela pressão farmacológica e multiplicam-se, resultando numa população que já não é sensível ao fármaco (20). Este mecanismo mutacional acontece independentemente do fármaco, sendo necessário em alguns casos apenas uma mutação pontual, múltiplos eventos de forma independente, ou aumento do número de cópias de um determinado gene ligado à resistência. A exposição do parasita a uma dose subterapêutica do fármaco promove e acelera a seleção destes mutantes, principalmente em doentes não imunes e de zonas de baixa endemicidade (20,50).

A designação de multirresistência a anti maláricos refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fenómeno este que tem sido observado em *P. falciparum*. A resistência cruzada entre anti maláricos está relacionada com os aspetos comuns dos seus mecanismos de ação, bem como dos mecanismos de resistência que lhes estão associados (51). Estirpes resistentes à cloroquina, SP, mefloquina e com suscetibilidade diminuída ao quinino foram já descritas (52,53,54). Atualmente, a região do globo mais afetada por este fenómeno de multirresistência é o sudeste asiático.

Múltiplos fatores contribuem para o aparecimento de resistências, entre os quais: características do fármaco, padrão de utilização do tratamento, fatores ligados ao hospedeiro humano, características do parasita e do vetor, e determinantes ambientais (55).

A eliminação lenta dos parasitas e o atraso na sua depuração é o principal fator que leva ao aparecimento de resistências (56). Esta condição surge principalmente aquando um tratamento inadequado, isto é, tratamento em monoterapia que favorece o desenvolvimento de estirpes resistentes ao fármaco em uso e doses subterapêuticas que possibilitam a recrudescência e falham ao nível da depuração (57).

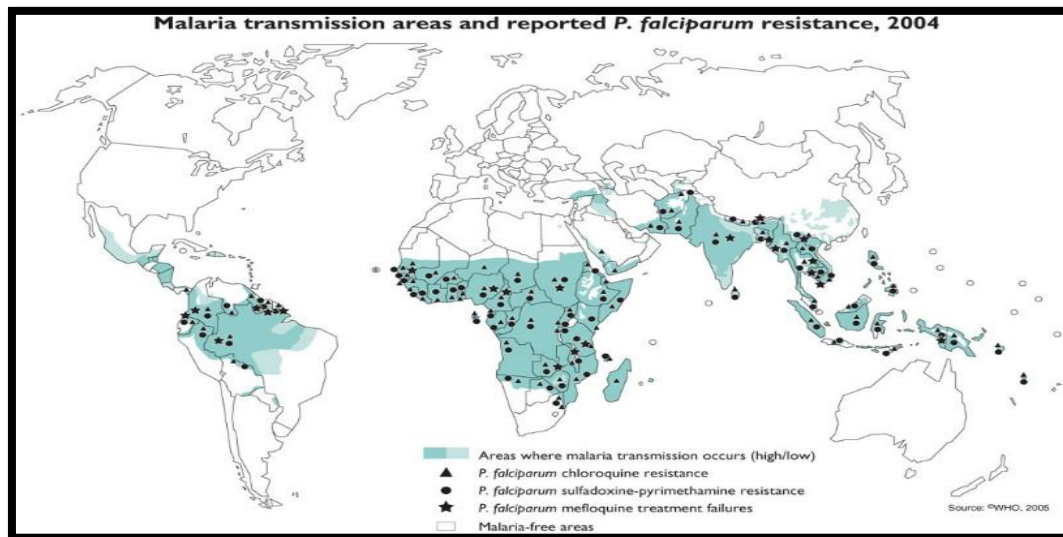


Figura I-2: Áreas de transmissão da Malária e resistências reportadas do *Plasmodium falciparum*. A azul pode observar-se as zonas de transmissão malárica (a azul mais claro áreas de menor transmissão e a mais escuro as mais elevadas). Com ▲ estão representadas as localidades onde foram reportadas resistências à Cloroquina; a ● simboliza regiões com existência de resistência à associação terapêutica Sulfadoxina-Pirimetamina e com as áreas onde o tratamento com Mefloquina apresenta falhas (adaptado de (58)).

Em 2015, cinco países no sudeste asiático reportaram resistências às artemisininas (Camboja, Tailândia, Vietname, República Democrática de Laos e Myanmar). A fronteira Camboja-Tailândia tem sido a região onde surge a maior parte das resistências e daqui espalham-se para as restantes regiões do Mundo (59).

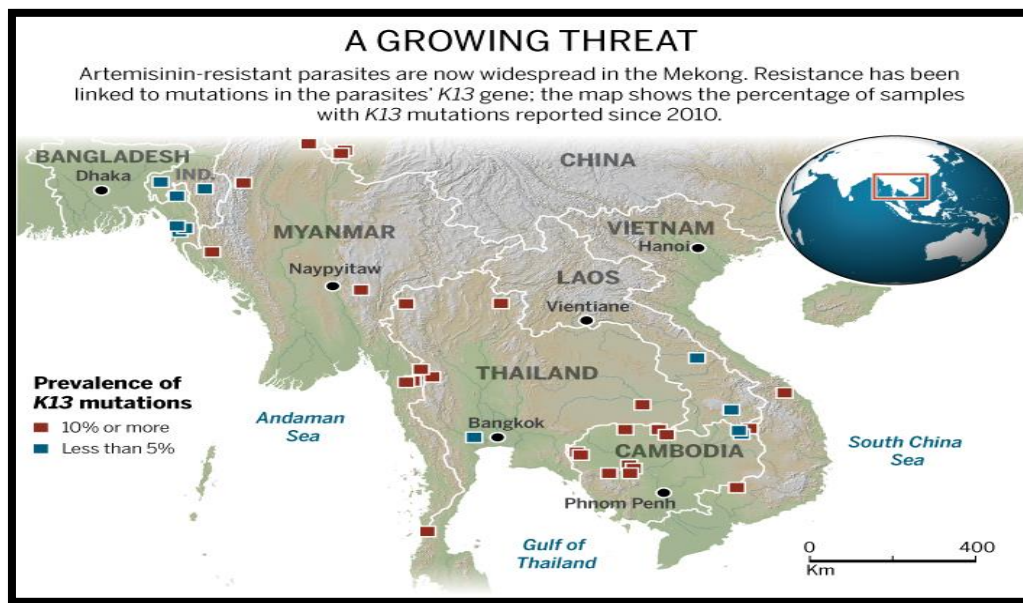


Figura I-3: Prevalência de mutações no *K13* no sudeste asiático. A resistência à artemisinina e aos seus derivados tem sido associada a mutações no gene *K13*. O mapa mostra com os quadrados a vermelho as localidades onde a prevalência desta mutação é superior a 10% e a azul prevalências inferiores a 5% (adaptado de (60)).

3. Avaliação do potencial anti malárico de novos compostos *in vitro*

Um aspecto importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos é a determinação da probabilidade de esses compostos permitirem a seleção de parasitas resistentes. A organização *Medicines for Malaria Venture* tem por missão a descoberta, produção e difusão de novos anti maláricos de modo sustentável (61). Esta desenvolveu recentemente uma estratégia padronizada para a avaliação do potencial anti malárico de novos compostos, incluindo a avaliação *in vitro* do risco de seleção de parasitas resistentes (62). Esta estratégia assenta em três objetivos:

a) Identificação de resistência cruzada;

Para alcançar este objetivo um dos métodos de se conhecer a possível existência de suscetibilidade a um determinado composto é a determinação do IC₅₀ (inibição do crescimento de 50% de parasitas) numa estirpe conhecida resistente a múltiplos fármacos e verificar a relação comparativamente ao IC₅₀ de uma estirpe sensível. O cálculo do índice de resistência (**IR**) (obtido pela razão entre o valor de IC₅₀ para a estirpe Dd2 e a estirpe 3D7) permite qualificar esta mudança e classificar um composto de acordo com o risco de existência de resistência (63,64). A estirpe 3D7 de *Plasmodium falciparum* é sensível às quinolinas (quinino, cloroquina, mefloquina) e a Dd2 é resistente à cloroquina e mefloquina.

b) Seleção de parasitas resistentes;

As estratégias para selecionar parasitas resistentes incluem a aplicação contínua de pressão com o composto em análise. Numa cultura celular parasitada, a pressão contínua com o composto, aumenta a possibilidade de deteção da existência de parasitas resistentes (65,66).

Um dos métodos utilizados é o *Minimal inoculum for resistance* (MIR). Mede indiretamente a possibilidade de ocorrência de um genótipo resistente. A determinação do MIR permite avaliar o risco de selecionar parasitas resistentes aos compostos em estudo. Uma vez que a estirpe Dd2 tem uma predisposição maior para aquisição de resistência (possivelmente devido a mecanismos deficientes de reparação de ADN) (67), esta estirpe é proposta para realizar o ensaio MIR (68).

c) Caracterização do modo de ação e mecanismo de resistência.

Na presença de parasitas recrudescentes, o último passo é a sua caracterização genética a fim de se compreender quais os mecanismos inerentes à resistência. Deste modo estudam-se as mutações pontuais que permitem ao parasita sobreviver à presença do composto a si dirigido, com recurso a técnicas de biologia molecular (13,62).

4. Fosfodiesterases

Alguns autores defendem que a evolução e conservação genética entre as duas espécies não é um entrave mas sim uma oportunidade de investigação de novos compostos, sendo disto exemplo o mecanismo de ação das fosfodiesterases de parasitas e humanos, biologicamente semelhantes (69).

No ser humano, as fosfodiesterases (PDEs) foram categorizadas de acordo com a semelhança entre a sequência de aminoácidos, as propriedades bioquímicas e a sua sensibilidade a possíveis inibidores. Foram, deste modo, agrupadas em 11 famílias, tendo como nomenclatura PDE1 a PDE11. O recurso a inibidores destas enzimas tem sido eficaz em tratamentos para a asma, disfunção erétil, trombose e doença pulmonar obstrutiva crónica (70).

As fosfodiesterases são um grupo de enzimas que têm como principal função a hidrólise da ligação 3'-fosfoester dos nucleótidos cíclicos monofosfatos cAMP e cGMP, convertendo-os em AMP e GMP, bloqueando a transmissão dos seus sinais celulares.

Níveis citoplasmáticos elevados de mensageiros secundários (cAMP, cGMP) permitem a ativação de proteínas essenciais para a sobrevivência do *P. falciparum* (proteínas kinase A e G responsáveis pela tradução dos sinais celulares dos monofosfatos) nomeadamente na gametogénese e invasão celulares (71). As fosfodiesterases controlam a produção destes mensageiros, reduzindo a sua acumulação celular.

Recorrendo a inibidores de fosfodiesterases, o aumento exponencial destes nucleótidos cíclicos leva a uma cascata de eventos que impossibilita a ocorrência de um ciclo de desenvolvimento normal pelo *Plasmodium falciparum* principalmente nas fases de invasão eritrocitária e gametogénese (71,72).

Um momento chave no desenvolvimento do *Plasmodium spp.* é a rutura da membrana eritrocitária com a libertação de merozoítos e a reinvasão destes para eritrócitos não parasitados. Com recurso a um inibidor conhecido de uma PDE humana (zaprinast), estudou-se o seu efeito em culturas de *Plasmodium falciparum* (72). Concluiu-se que estes inibidores ao impedirem a hidrólise de cGMP conduzem a uma drástica reorganização celular com a descarga de exonemas e micronemas e consequente libertação de merozoítos prematuros, incapazes de realizar o seu mecanismo de reinvasão (73).

Estudos anteriores desenvolvidos com pirroloquinolonas demonstraram a eficácia destes compostos na inibição de fosfodiesterases humanas (74).

Uma vez que a função destas enzimas é crucial ao desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* e que o recurso a inibidores destas leva à inibição do seu crescimento (72,73) procedeu-se à criação de uma biblioteca de pirroloquinolonas (compostos sintetizados no Departamento de Química, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pelo grupo do Professor Rui Moreira (<http://imed.ulisboa.pt/cv/rui-moreira/>)) e esta tese visa testar a sua susceptibilidade *in vitro* em culturas de *P.falciparum*.

II- OBJETIVOS

Na ausência de uma vacina eficaz, o controlo da malária está atualmente, em grande medida, dependente do uso de fármacos anti maláricos. Não existem alternativas viáveis aos ACTs, pelo que é urgente a rápida identificação e/ou síntese de novas moléculas candidatas a fármacos anti maláricos; idealmente quimicamente distintas das existentes.

No contexto deste trabalho foi analisada a atividade anti malárica de 40 compostos derivados de inibidores de fosfodiesterases sintetizados no Departamento de Química, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pelo grupo do Professor Rui Moreira (<http://imed.ulisboa.pt/cv/rui-moreira/>).

1. Objetivo Geral

Caracterizar a atividade anti malárica de compostos inibidores de fosfodiesterases *in vitro* usando estirpes sensíveis e resistentes de *Plasmodium falciparum*.

2. Objetivos Específicos

2.1. – Determinar o valor de IC₅₀ dos compostos nas estirpes 3D7 e Dd2 de *Plasmodium falciparum*.

2.2. - Determinação do inóculo mínimo para resistência (MIR) na estirpe Dd2 de *Plasmodium falciparum*.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

1. Soluções e Meios de Cultura

1.1. Meio de cultura RPMIc

Para o meio de cultura de *Plasmodium falciparum* dissolveram-se 10,44g/L de meio RPMI 1640, num Litro de água MiliQ, suplementado com 5 g de Albumax, 0,1g de Hipoxantina, 5,94 g de HEPES (4- (hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) e com 3,8% (v/v) de bicarbonato de sódio a 5% (w/v). A solução final foi esterilizada através da sua passagem por um filtro com poro de 0.22µm e armazenada a 4°C, sendo o seu pH de 7,4.

1.2. Solução PBS (Phosphate Buffered Saline)

A 200 mL de água destilada adicionou-se uma pastilha de PBS. A mistura foi mantida a 4°C após ser autoclavada.

1.3. Solução de Sorbitol a 5%

Diluíram-se 50g de D-Sorbitol em água destilada no volume final de 1L. A solução foi armazenada a 4°C após filtragem com filtro com poro de 0.22µm.

1.4. Solução Corante Giemsa a 20%

Foram adicionados 10 mL de uma solução de Giemsa puro a 40 mL de água destilada. A mistura foi posteriormente armazenada a 4°C após ter sido filtrada com filtro de papel.

1.5. Compostos MS

A cada um dos 40 compostos MS individualmente numerados e liofilizados juntou-se DMSO de modo a ser obtida uma concentração final de 5mM para cada um (propriedades dos compostos e volumes a adicionar discriminados no Anexo I) ficando os compostos dissolvidos a 100%. Fizeram-se algumas diluições intermédias de modo a se atingir a concentração final de 0.2%. As soluções foram armazenadas por congelação.

1.6. Cloroquina

Pesou-se a CQ e adicionou-se DMSO de modo a se obter uma concentração final de 10µM.

1.7. Solução de eritrócitos humanos não parasitados a 50%

Com recurso ao sistema Vacutainer® (tubos suplementados com EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*), colheu-se sangue total venoso a doadores voluntários do IHMT, saudáveis, sem história de contacto prévio com *Plasmodium spp*, através de punção venosa. O sangue total foi centrifugado a 2500 rpm durante 3 minutos e o plasma foi

aspirado. De modo à solução ficar reduzida a eritrócitos, o *pellet* resultante da aspiração foi lavado com PBS recorrendo-se à centrifugação. Este último passo foi repetido 3 vezes. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi removido por aspiração. À quantidade final de eritrócitos juntou-se igual quantidade de meio RPMIc ficando a solução final com um hematócrito de 50%. A mistura foi armazenada a 4°C.

1.8. Solução de SYBRGreen I

Juntaram-se 2µL da solução pura de SYBRGreen a 1mL de PBS. A mistura foi congelada para armazenamento.

2. Culturas de *Plasmodium falciparum*

2.1. Estirpes de *P. falciparum*

Estirpe 3D7. Esta foi originada a partir da NF54 após diluições limitadas e é caracterizada pela sua sensibilidade à Cloroquina (75).

Estirpe Dd2. Após pressão *in vitro* com mefloquina em culturas de W2 (76) originou-se a Dd2, resistente quer à mefloquina como à cloroquina (77).

2.2. Manutenção das culturas

As culturas de *P. falciparum* foram mantidas em frascos de *stock* a um hematócrito de 5% (300 µL RBCs/ 3 mL RPMIc), e sem exceder os 5% de parasitémia. Os frascos de cultura foram mantidos a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ (78). O meio de cultura RPMIc foi substituído diariamente.

2.3. Monitorização das culturas

De modo a verificar o desenvolvimento das culturas de *P.falciparum*, foram realizados diariamente esfregaços em lâmina. De seguida foram fixados com metanol a 100% e corados com Giemsa a 20%. A examinação das lâminas e contagem de parasitémia foi feita através de microscopia ótica numa ampliação de 1000x.

2.4. Sincronização das culturas

Procedeu-se à sincronização das culturas de modo a obter as formas mais jovens do parasita, anéis.

Após centrifugação das culturas a 2500 rpm durante 5 minutos e aspiração do sobrenadante, adicionam-se 9mL de sorbitol a 5%. Procedeu-se a uma agitação manual

vigorosa e incubou-se a 37°C durante 5 minutos. O último passo é repetido uma vez. De seguida centrifugou-se novamente a 2500 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi aspirado. Juntou-se PBS (9mL), ressuspendeu-se o *pellet* e centrifugou-se para lavagem. Este passo é repetido novamente. Após última aspiração, o *pellet* foi reconstituído com RBCs não parasitados e finalmente adicionou-se meio RPMIc num total de 10mL com um hematócrito de 5% (79).

3. Avaliação do potencial anti malárico dos novos compostos in vitro

3.1. Determinação do IC₅₀

Para a determinação dos valores de IC₅₀ utilizaram-se culturas das estirpes 3D7 e Dd2 de *Plasmodium falciparum* sincronizadas em anéis. O método utilizado para esta determinação foi o SYBR Green I baseado em Bennet *et al* (ver figura III-1) (80).

Para a leitura da intensidade de fluorescência, recorreu-se a um fluorímetro que realiza a leitura de placas a 485 nm de excitação e 528 nm de emissão.

De modo a calcular-se a percentagem de sobrevivência de parasitas, calculou-se (relativamente ao poço sem composto - controlo) os valores de fluorescência para cada poço. Os valores são expressos em RFUs (relative fluorescence units).

Para a determinação do valor de IC₅₀ utilizou-se o *Software GraphPad Prism version 6.0 (Trial) 2015*, que efetua este cálculo com recurso a uma regressão não-linear com base numa curva de dose-resposta.

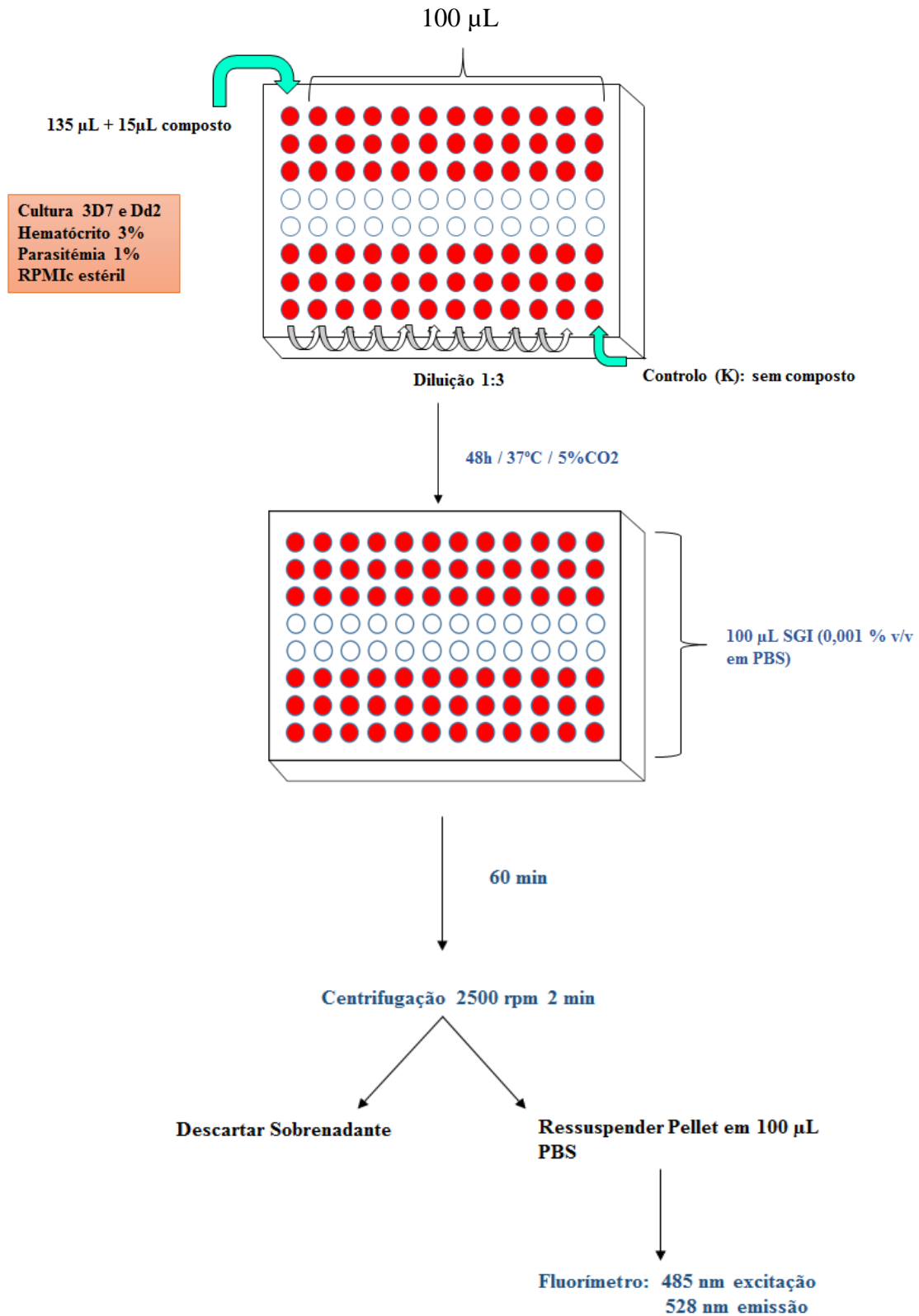


Figura III-1: Ensaio para determinação de IC₅₀ pelo método de SYBR Green I.

3.2. Avaliação do risco de seleção de parasitas resistentes usando o MIR.

As culturas da estirpe Dd2 foram inicialmente sincronizadas (ver 2.3) e mantidas com meio RPMIc com gentamicina (200 μ L/L) e o composto numa concentração 10 vezes superior à do valor do respetivo IC₅₀. Foram realizados inóculos de 2×10^6 , 2×10^7 e 2×10^8 de parasitas em culturas individuais com 10mL e hematócrito de 3%. Cada inóculo foi realizado em triplicado. As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂, com mudança, de meio e composto, diária pelo período de 60 dias. A viabilidade e presença ou ausência de recrudesência foi visualizada diariamente com recurso a lâmina corada com Giemsa a 20%.

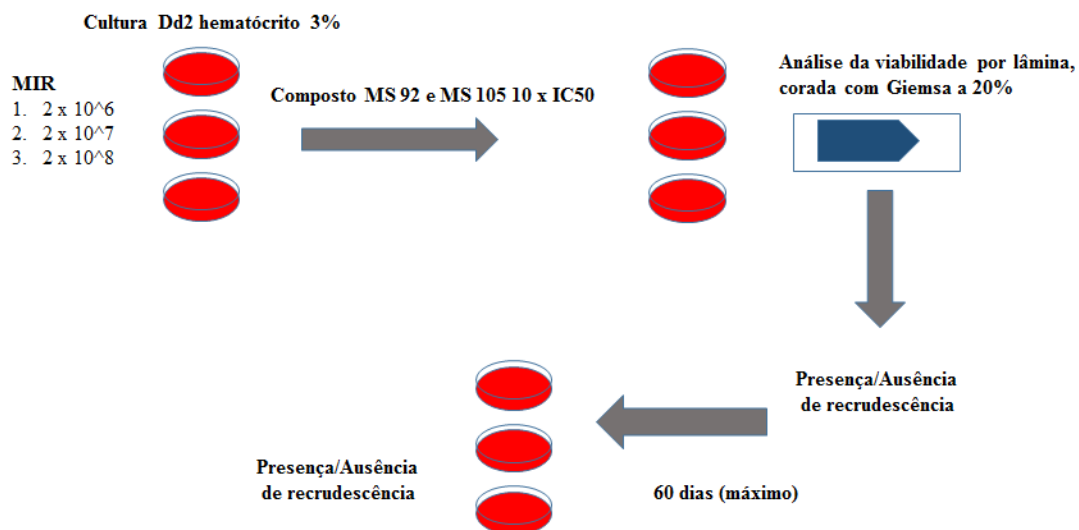


Figura III-2: Determinação do risco de frequência de resistência pelo método MIR.

IV-RESULTADOS/DISCUSSÃO

1. Atividade anti malárica *in vitro* dos compostos nas estirpes 3D7 e Dd2 de *Plasmodium falciparum*

A síntese de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos é um método moroso e dispendioso. Assim, a modificação estrutural de moléculas já conhecidas com efeito anti malárico, é uma alternativa.

A utilização da estrutura pirroloquinolona para a criação de novos possíveis fármacos, pode diminuir o tempo de produção e os custos associados.

Neste trabalho procedeu-se à avaliação de 40 compostos (derivados de pirroloquinolonas) que apresentam como alvo terapêutico as fosfodiesterases parasitárias. A inibição destas fosfodiesterases tem implicações ao nível do crescimento, desenvolvimento e gametogénese do parasita, levando à sua depuração e eliminação.

Como controlo utilizou-se a cloroquina.

1.1. Determinação do IC₅₀ dos compostos

Através do cálculo do IC₅₀ é possível determinar a eficácia de um composto *in vitro* e avaliar a existência de resistência cruzada com outros fármacos (62). Um dos marcos que define a resistência a um fármaco é a existência de um *shift* do IC₅₀ comparativamente ao de uma cultura com uma estirpe sensível.

Com recurso às estirpes 3D7 (sensível) e Dd2 (resistente à CQ e MQ) calculámos os valores de IC₅₀ e o índice de resistência. Como descrito na literatura (81) os valores de IC₅₀ de um composto aceitável devem estar na ordem dos nanomolar. Os valores máximos aceitáveis variam, podendo ser por volta dos 20nM (CQ) ou dos 800nM (quinino) para uma estirpe sensível.

O IR permite avaliar o nível de resistência, isto é, quanto maior o valor do índice maior a probabilidade de uma estirpe ser resistente ao composto em análise e de apresentar resistência cruzada uma vez que não é efetivo ao inibir uma estirpe resistente a um determinado grupo de fármacos. Valores acima de 100 são indicativos de grande nível de resistência e abaixo de 10 de nível de resistência intermédio (82).

Todos os 40 compostos MS foram avaliados *in vitro* em cultura de *Plasmodium falciparum* 3D7 em triplicados e com o mínimo de duas repetições por composto, tendo sido determinados os seus valores de IC₅₀. Na Figura IV apresentamos gráficos (representativos) correspondentes aos 28 compostos em que foi possível obter uma curva dose-resposta consistente para o intervalo de concentrações testadas (10.000 – 0.1693 nM).

Os compostos com resultados mais promissores, isto é, menor valor de IC₅₀ e curvas dose-resposta coerentes foram testados de igual modo mas numa cultura resistente (Dd2). Na Tabela II estão discriminados os valores das determinações e na Figura IV as respetivas representações gráficas.

Pela sensibilidade da estirpe 3D7 e a resistência da estirpe Dd2, a cloroquina foi o fármaco utilizado como controlo dos ensaios realizados para os compostos MS.

Tabela II - Atividade anti malárica *in vitro* dos compostos em estudo contra estirpes sensível e resistente de *P. falciparum*. O valor da média do IC₅₀ apresentado, resulta de pelo menos três determinações independentes, em duplicado. **Dp**, desvio padrão; **CQ**, cloroquina; **3D7** estirpe sensível à cloroquina e mefloquina; **Dd2** estirpe resistente à cloroquina e mefloquina; **IR** índice de resistência (calculado pela razão entre o valor de IC₅₀ para a estirpe Dd2 e a estirpe 3D7).

COMPOSTO	ESTIRPE	IC 50 (nM)		IR	COMPOSTO	ESTIRPE	IC 50 (nM)		IR
		MÉDIA	DP				MÉDIA	DP	
MS30	3D7	1993,3	526,1	1,22	MS114	3D7	31,9	6,4	3,58
	Dd2	2429,5	545,18			Dd2	114,27	19,88	
MS39	3D7	1022,3	149,4	2,42	MS127	3D7	1731,85	1082	0,37
	Dd2	2474	975,807			Dd2	645	403,05	
MS61	3D7	3362,5	429,2	0,34	MS118	3D7	658,2	18	0,71
	Dd2	1149,5	207,18			Dd2	464,9	38,33	
MS82	3D7	773,7	18,7	5,22	MS117	3D7	173,8	156,7	2,30
	Dd2	4035	106,07			Dd2	399,9	409,13	
MS63	3D7	19,5	4,7	29,93	MS147	3D7	80,5	16,3	2,01
	Dd2	583,73	393,59			Dd2	161,9	137,51	
MS99	3D7	39,9	14,1	11,53	MS132	3D7	3136,5	89,8	0,19
	Dd2	460,13	50,56			Dd2	589,5	507,85	
MS81	3D7	65,3	10,6	6,23	MS141	3D7	1248	147,1	0,96
	Dd2	406,67	95,57			Dd2	1193	5,66	
MS88	3D7	50,3	0,2	2,67	MS142	3D7	81,3	49,9	6,31
	Dd2	134,05	0,07			Dd2	512,8	172,86	
MS90	3D7	137,9	6,9	1,26	MS186	3D7	68,6	11,6	0,75
	Dd2	173,1	57,42			Dd2	51,24	12,99	
MS92	3D7	44	22,2	1,89	MS180	3D7	98,53	25,56	0,87
	Dd2	83,11	20,21			Dd2	85,66	32,24	
MS94	3D7	58,8	13,4	1,53	MS176	3D7	404,35	130,04	0,84
	Dd2	90,15	5,2			Dd2	338,45	11,38	
MS98	3D7	1385	203,6	1,84	MS146	3D7	62,4	12,1	3,67
	Dd2	2550	697,21			Dd2	229,1	84,43	
MS101	3D7	402,6	106,7	3,76	MS181	3D7	245,5	59,54	1,45
	Dd2	1515,5	463,16			Dd2	357,1	85,42	
MS103	3D7	1967,5	2,1	0,87	CQ	3D7	20	5	15,00
	Dd2	1710	667,51			Dd2	300	80	
MS105	3D7	33,2	6,6	5,24					
	Dd2	174,13	34,9						

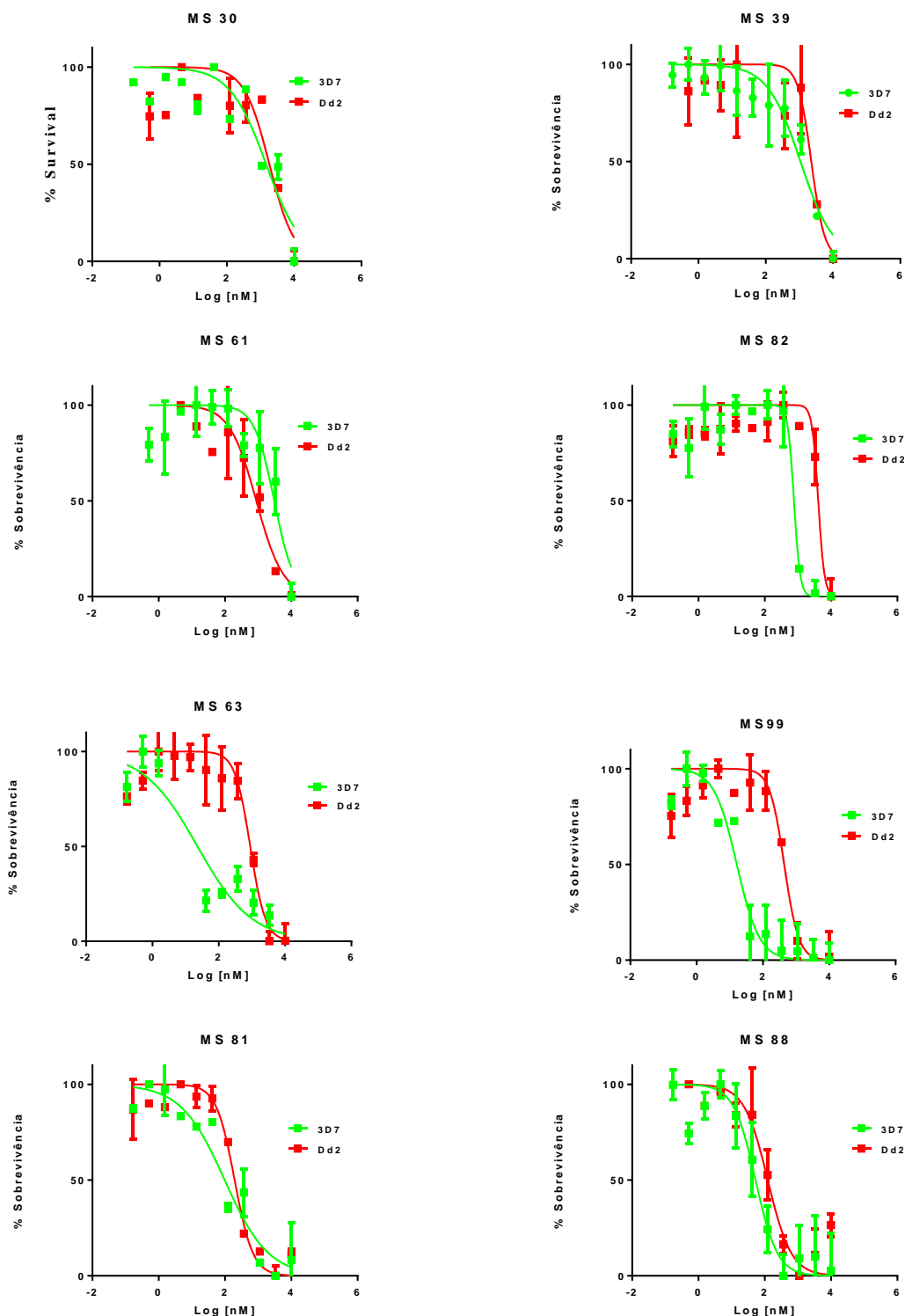


Figura IV – Valores de concentração inibitória para *Plasmodium falciparum*. Verde: estirpe 3D7. Vermelho-estirpe Dd2. Curvas dose-resposta com função de regressão não linear representativas de ensaios repetidos pelo menos duas vezes para cada estirpe.

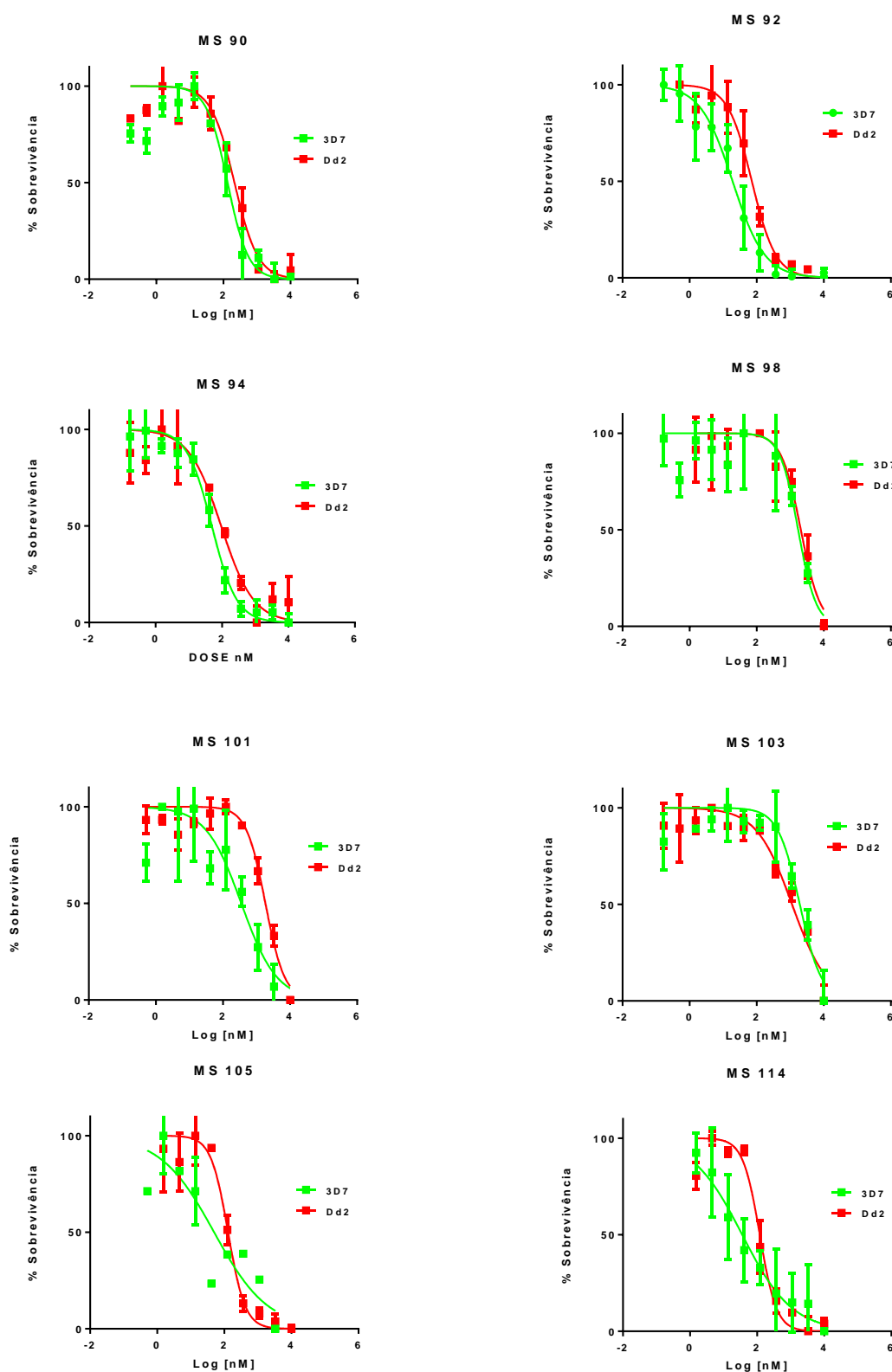


Figura IV – Valores de concentração inibitória para *Plasmodium falciparum*. Verde: estirpe 3D7. Vermelho-estirpe Dd2. Curvas dose-resposta com função de regressão não linear representativas de ensaios repetidos pelo menos duas vezes para cada estirpe. Continuação.

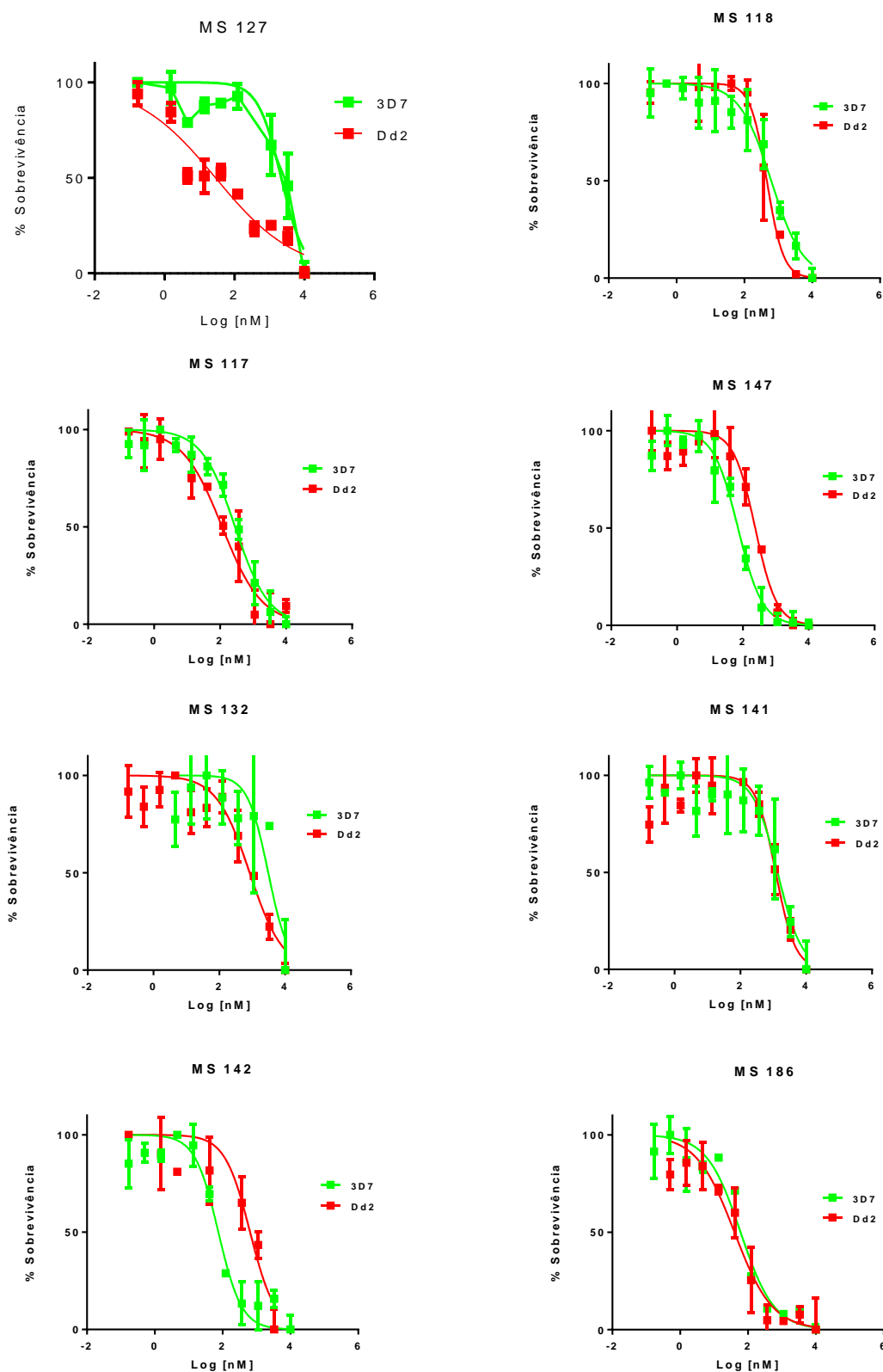


Figura IV – Valores de concentração inibitória para *Plasmodium falciparum*. Verde: estirpe 3D7. Vermelho-estirpe Dd2. Curvas dose-resposta com função de regressão não linear representativas de ensaios repetidos pelo menos duas vezes para cada estirpe. Continuação.

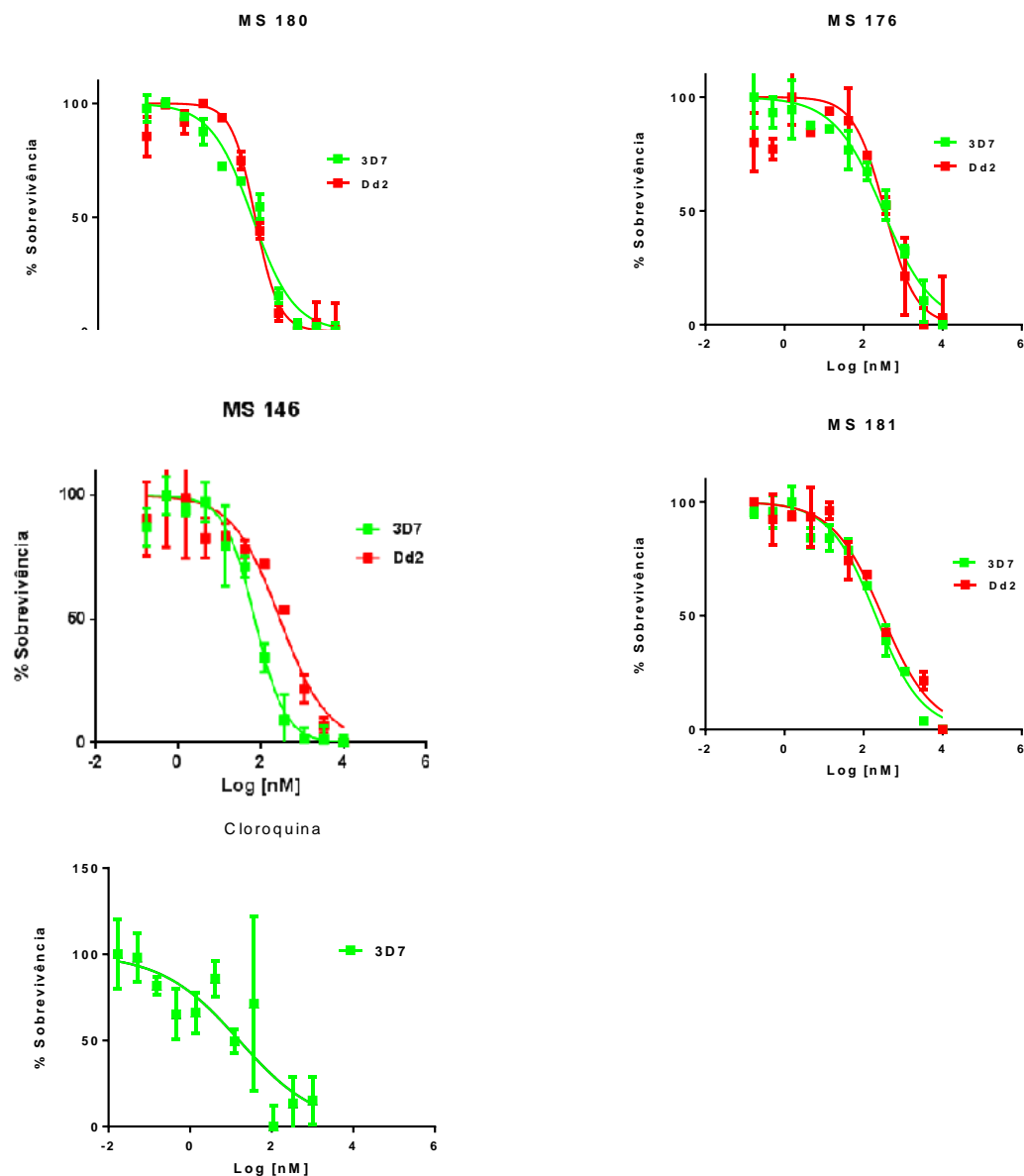


Figura IV–Valores de concentração inibitória para *Plasmodium falciparum*. Verde: estirpe 3D7. Vermelho-estirpe Dd2. Curvas dose-resposta com função de regressão não linear representativas de ensaios repetidos pelo menos duas vezes para cada estirpe. Continuação.

Num estudo de Yuasa *et al.* em 2005 está descrito o primeiro composto identificado como um potente inibidor de fosfodiesterases humanas: zaprinast. Concluiu-se que este fármaco inibe a proliferação do *P. falciparum* com um valor de IC₅₀ na ordem dos 3.8 µM (70).

Estudos posteriores com outros compostos, possíveis anti maláricos, tendo como alvo as fosfodiesterases parasitárias apresentaram resultados promissores com valores de IC₅₀ entre os 0.4 e os 40 µM (71).

O Índice de Resistência (IR) foi inferior a 10 para todos os compostos exceto 2, MS63 (IR=29.9) e MS99 (IR=11.5) os quais apresentam IR próximo ao da cloroquina para estas estirpes, indicativo da possibilidade de resistência cruzada contra estes.

Os restantes compostos demonstram atividade apreciável contra estirpes não só sensíveis - 3D7 como resistentes a quinolinas – Dd2 (cloroquina, mefloquina) o que é indicativo de inexistência de resistência cruzada com este grupo, sendo provável a existência de mecanismos de ação diferentes (83).

Os compostos representados no Anexo II apresentam uma curva dose-resposta não viável biologicamente. Este tipo de gráfico é sugestivo de compostos sem atividade podendo ser impuros ou degradar-se em cultura.

O composto MS175 não apresenta resultado pela impossibilidade da sua representação tanto gráfica como numérica.

2. Avaliação do risco de desenvolvimento de resistência

2.1. Determinação do inóculo mínimo para avaliar resistência (MIR) na estirpe Dd2 de *Plasmodium falciparum*.

De modo a avaliar o risco de desenvolvimento de resistência aos compostos com melhor atividade (MS92 e MS105) utilizou-se a estirpe Dd2 em cultura para a determinação do MIR. A estirpe Dd2 apresenta um fenótipo de resistência acelerada a múltiplos fármacos (ARMD – *accelerated resistance to multiple drugs*) sendo ideal na investigação de mutações raras nos pequenos volumes que albergam as culturas *in vitro* (62).

A seleção de estirpes resistentes é um método lento que pode levar meses a anos a produzir resultados. Alguns estudos otimizaram este método de seleção (68) encurtando o tempo de execução para 60 dias, aplicando pressão com fármaco constante às culturas de *Plasmodium falciparum* presente em inóculos diferentes, para determinar o inóculo mínimo para resistência.

No nosso trabalho realizámos o MIR e recorremos a três inóculos diferentes (ver secção métodos). Foi utilizada a estirpe Dd2 e os compostos MS92 e MS105. O primeiro por apresentar valores de IC_{50} para as duas estirpes abaixo dos 100nM e consequentemente um IR de baixo nível de resistência e o segundo pela evidência de um IR superior e do valor de IC_{50} para a estirpe Dd2 acima do patamar dos 100 nM, mas ainda assim próximo do valor para a estirpe sensível (Tabela II). Foi utilizada a microscopia ótica para avaliar a viabilidade dos parasitas diariamente. Em todos os inóculos (cada um realizado em triplicado) foi possível observar que grande parte dos parasitas sujeitos à pressão do composto perderam a viabilidade ao fim de alguns dias e os que se mantêm viáveis apresentam atraso no desenvolvimento (estado de quiescência). Os parasitas que não foram sujeitos à pressão do composto (controlo) mostraram um desenvolvimento normal, exibindo as diferentes fases em cultura (anel, trofozoíto e esquizonte).

Tabela III- Determinação do MIR. Resultados ao fim de 60 dias de pressão com os compostos MS92 e MS105.

COMPOSTO	INÓCULO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO À PRESSÃO COM FÁRMACO (dias)	PRESENÇA DE RECRUDESCÊNCIA (dias)
MS92	2×10^6	60	Não
	2×10^7	60	Não
	2×10^8	60	Não
MS105	2×10^6	60	Não
	2×10^7	60	Não
	2×10^8	60	Não

Nenhum dos dois compostos (MS92 e MS105) selecionados para determinação de MIR apresentou risco apreciável para desenvolvimento de resistência futura dado que nenhum apresentou parasitas viáveis após 60 dias de cultura sob pressão constante de composto em todos os inóculos testados.

Na avaliação do risco de resistência um composto, um dos alertas a considerar é o aumento do valor de IC_{50} na estirpe Dd2 (comparativamente à estirpe 3D7) em combinação com um valor de MIR reduzido. Um MIR igual ou inferior a 10^5 alerta para um risco acrescido uma vez que sugere que uma mutação num único nucleótido é suficiente para a existência de resistência. Um MIR de 10^7 pode ser considerado de alto risco se combinado com um aumento do valor de IC_{50} na ordem das vinte vezes.

Comparativamente ao resultado obtido num estudo com a cloroquina cujo MIR corresponde a 10^8 , os compostos MS92 e MS105 demonstram uma menor probabilidade de possível existência de resistência às quinolinas (62,83).

V- CONCLUSÃO

O número de mortes atribuídas à malária bem como a quantidade de pessoas que se encontram anualmente em risco de a contrair levam à necessidade do estudo e síntese de novos compostos mais eficazes. A realização de testes de suscetibilidade *in vitro* torna possível a avaliação da sua atividade anti malárica e eficácia na inibição do crescimento e desenvolvimento do *Plasmodium spp.*

Os compostos pirroloquinolonas demonstram ser eficazes contra estipes sensíveis (3D7) e estirpes resistentes à cloroquina e mefloquina (Dd2). Os valores de IC₅₀ e os índices de resistência calculados para alguns destes compostos são mais promissores que os dos fármacos atualmente em uso no tratamento da malária.

O baixo risco de resistência determinado pelo método do *inóculo mínimo para resistência* (MIR) para os compostos MS92 e MS105 comparado com o risco existente para a cloroquina, assinalam a potencialidade destes como possíveis fármacos anti maláricos a desenvolver.

No futuro, devem ser realizados testes mais detalhados de modo a compreender-se os seus mecanismos de ação bem como a sua toxicidade. O estudo em modelos murinos deve ser considerado uma prioridade pela promissora eficácia que os compostos apresentam.

VI-BIBLIOGRAFIA

1. Despommier D, Gwadz R, Hotez P, Knirsch P. The malarias in: Parasitic Diseases, 5ª edição. New York: Apple Trees Productions; 2005. 50 – 68 p.
2. Singh B, Daneshvar C. *Plasmodium knowlesi* in Malaysia. Med J Malaysia. Setembro de 2010; 65(3):166-72.
3. Tuteja R. Malaria – na overview. FEBS J. Setembro de 2007; 274(18):4670-9.
4. Wiley J, & sons. Severe malaria. Trop Med Int Health. Setembro de 2014; 19 Suppl 1:7-131. doi: 10.1111/tmi.12313_2.
5. Cook CG, Zumla A. Manson's Tropical Diseases. 23rd edition. Saunders Elsevier. 2003. ISBN: 9781416044710, Section 7.
6. Breman JG, Campbell CC. Combating severe malaria in African children. Bulletin of the World Health Organization. 1988;66(5):611-620.
7. Guyatt HL, Snow RW. Impact of Malaria during Pregnancy on Low Birth Weight in Sub-Saharan Africa. Clinical Microbiology Reviews. 2004;17(4):760-769.
8. WHO. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 40-44.
9. Silvie O, Mota M, Matuschewski K, Prudêncio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. Curr Opin Microbiol. Agosto de 2008; 11(4):352-9.
10. Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. Developmental and comparative immunology. Dezembro de 2010;34(4):387-395.
11. WHO. Guidelines for the treatment of malaria (INTERNET). World Health Organization 2015. ISBN: 9789241549127. Obtido de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf. Acedido a Dezembro de 2016.
12. Mahende C, Ngasala B, Lusingu J, et al. Performance of rapid diagnostic test, blood-film microscopy and PCR for the diagnosis of malaria infection among febrile children from Korogwe District, Tanzania. *Malaria Journal*. 2016;15:391.
13. WHO. Universal access to malaria diagnostic testing (INTERNET). World Health Organization. 2011. ISBN 978 92 4 150209 2. Obtido de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44657/1/9789241502092_eng.pdf. Acedido a Dezembro de 2016.
14. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1087-1089.

15. Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, Schallig HD, Mens PF, Leeflang MM. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. *Malaria Journal*. 2011;10:321.
16. Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malaria Journal*. 2016;15:88.
17. Walker PGT, Floyd J, ter Kuile F, Cairns M. Estimated impact on birth weight of scaling up intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy given sulphadoxine-pyrimethamine resistance in Africa: A mathematical model. Mueller I, ed. *PLoS Medicine*. 2017;14(2):e1002243.
18. WHO. Date Accessed. Malaria Vaccine Rainbow Tables (INTERNET). Obtido de: http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html. Acedido em Dezembro de 2016.
19. Talisuna AO, Noor AM, Okui AP, Snow RW. The past, present and future use of epidemiological intelligence to plan malaria vector control and parasite prevention in Uganda. *Malaria Journal*. 2015;14:158.
20. WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance (INTERNET). 2000-2010. Obtido de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44449/1/9789241500470_eng.pdf. Acedido a Novembro de 2016.
21. Flannery EL, Chatterjee AK, Winzeler EA. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Microbiol*. Dezembro de 2013;11(12):849-62.
22. Arav-Boger R, Shapiro TA..Molecular mechanisms of resistance in antimalarial chemotherapy: the unmet challenge. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:565-85.
23. Cowman AF, Foote SJ.Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int J Parasitol*. Julho de 1990;20(4):503-13. Review.
24. Corey VC, Lukens AK, Istvan ES, Lee MC, Franco V, Magistrado P, Coburn-Flynn O, Sakata-Kato T, Fuchs O, Gnädig NF, Goldgof G, Linares M, Gomez-Lorenzo MG, De Cózar C, Lafuente-Monasterio MJ, Prats S, Meister S, Tanaseichuk O, Wree M, Zhou Y, Willis PA, Gamo FJ, Goldberg DE, Fidock DA, Wirth DF, Winzeler EA. A broad analysis of resistance development in the malaria parasite. *Nat Commun*. 2016 15;7:11901.
25. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*. Setembro de 2001 15;184(6):770-6. Epub 2001 Aug 7. Review.

26. Feillet N, Agnamey P, Brasseur P, Druilhe P. In vivo resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in Anjouan (Comoros) (in French) Bull Soc Pathol Exot. 1993;86:48–51.13.
27. Djimde A, Doumbo O, Cortese J, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. N Eng J Med. 2001;344:257–263.
28. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. Am J Trop Med Hyg. Agosto de 2003;69(2):184-7.
29. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. FEBS Lett. Junho de 2011;585(11):1551-62.
30. Webster HK, Thaithong S, Pavanand K, Yongvanitchit K, Pinswasdi C, Boudreau EF. Cloning and characterization of mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. Am J Trop Med Hyg. Novembro de 1985 ;34(6):1022-7.
31. Witkowski B, Iriart X, Soh PN, et al. pfmdr1 Amplification Associated with Clinical Resistance to Mefloquine in West Africa: Implications for Efficacy of Artemisinin Combination Therapies . Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(10):3797-3799.
32. Phompradit P, Muhamad P, Cheoymang A, Na-Bangchang K. Preliminary Investigation of the Contribution of CYP2A6, CYP2B6, and UGT1A9 Polymorphisms on Artesunate-Mefloquine Treatment Response in Burmese Patients with *Plasmodium falciparum* Malaria. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2014;91(2):361-366.
33. Sutherland CJ, Laundry M, Price N, et al. Mutations in the *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene are associated with delayed parasite recrudescence in malaria patients treated with atovaquone-proguanil. Malaria Journal. 2008;7:240.
34. Pimentel S, Nogueira F, Benchimol C, et al. Detection of atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene in Luanda, Angola. Malaria Journal. 2006;5:30.
35. Li, X., Chen, H., Oo, T.H., Daly, T.M., Bergman, L.W., Liu, S.C., et al. A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. J Biol Chem 2010;279: 5765–5771.
36. Fairhurst RM, Dondorp AM. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Microbiology spectrum. 2016;4(3):10.1128/microbiolspec.EI10-0013-2016.
37. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. The New England journal of medicine. 2009;361(5):455-467.

38. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. Fevereiro de 2014;383(9918):723-35.
39. Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505(7481):50-55.
40. Pradel G, Schlitzer M. Antibiotics in malaria therapy and their effect on the parasite apicoplast. *Curr Mol Med*. Abril de 2010;10(3):335-49. Review.
41. Briolant S, Henry M, Oeuvray C, et al. Absence of Association between Piperaquine In Vitro Responses and Polymorphisms in the *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfmrp*, and *pfhhe* Genes in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(9):3537-3544.
42. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature*. Junho de 1996;381(6582):482.
43. Waller RF, McFadden GI. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol*. Janeiro de 2005;7(1):57-79. Review.
44. Sidhu AB, Sun Q, Nkrumah LJ, Dunne MW, Sacchettini JC, Fidock DA. In vitro efficacy, resistance selection, and structural modeling studies implicate the malarial parasite apicoplast as the target of azithromycin. *J Biol Chem*. Janeiro de 2007;282(4):2494-504.
45. Goodman CD, Su V, McFadden GI. The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. Abril de 2007;152(2):181-91.
46. Burkhardt D, Wiesner J, Stoesser N, Ramharter M, Uhlemann AC, Issifou S, Jomaa H, Krishna S, Kremsner PG, Borrmann S. Delayed parasite elimination in human infections treated with clindamycin parallels 'delayed death' of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Int J Parasitol*. Junho de 2007;37(7):777-85.
47. Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. Setembro de 2006;50(9):3124-31.
48. Beteck RM, Smit FJ, Haynes RK, N'Da DD. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. *Malaria Journal*. 2014;13:339.
49. Leshner G, Froelich E, Gruett M, Bailey J, Brundage R. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem*. 1962; 91:1063–1065.
50. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*. Agosto de 2004;20;305(5687):1124.

51. Le Bras J, Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol*. Abril de 2003;17(2):147-53. Review.
52. Syafruddin D, Asih PB, Coutrier FN, Trianty L, Noviyanti R, Luase Y, Sumarto W, Caley M, van der Ven AJ, Sauerwein RW. Malaria in Wanokaka and Loli sub-districts, West Sumba District, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. Maio de 2006;74(5):733-7
53. Syafruddin D, Asih PB, Casey GJ, Maguire J, Baird JK, Nagesha HS, Cowman AF, Reeder JC. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. Fevereiro de 2005;72(2):174-81.
54. Syafruddin D, Asih PB, Siregar JE, Tjitra E. Molecular basis of antimalarial drug resistance in Indonesia. *Adv Exp Med Biol*. 2003;531:103-15. Review
55. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. Abril de 2002;2(4):209-18. Review.
56. Fidock DA, Eastman RT, Ward SA, Meshnick SR. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends in parasitology*. 2008;24(12):537-544.
57. Duarte E, Pang L, Ribeiro L, Fontes C. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:471- 6.
58. WHO. Guidelines for the Treatment of Malaria (INTERNET). WHO. 2006. Obtido de: <http://helid.digicollection.org/en/d/Js13418e/14.6.html>. Acedido a Outubro de 2016.
59. WHO. World Malaria Report 2015 (INTERNET). Geneva. 2016. ISBN 978 92 4 156515 8. Obtido de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf. Acedido a Fevereiro de 2017.
60. Roberts L. Drug resistance triggers war to wipe out malaria in the Mekong region. *Science*. Abril de 2016. Obtido de: <http://www.sciencemag.org/news/2016/04/drug-resistance-triggers-war-wipe-out-malaria-mekong-region>. Acedido a Novembro de 2016.
61. MMV. Our mission and vision. 2016. Obtido de: <https://www.mmv.org/about-us/our-mission-vision>. Acedido a Janeiro de 2017.
62. Ding XC, Ubben D, Wells TN. A framework for assessing the risk of resistance for anti-malarials in development. *Malaria Journal*. 2012;11:292.

63. 58.Nzila A, Mwai L. In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(3):390-398.
64. Wong RPM, Karunajeewa H, Mueller I, Siba P, Zimmerman PA, Davis TME. Molecular Assessment of *Plasmodium falciparum* Resistance to Antimalarial Drugs in Papua New Guinea Using an Extended Ligase Detection Reaction Fluorescent Microsphere Assay . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(2):798-805.
65. Artemisinin in *Plasmodium falciparum* Is Mediated by a Quiescence Mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(5):1872-1877.
66. Ross LS, Gamo FJ, Lafuente-Monasterio MJ, et al. In Vitro Resistance Selections for *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors Give Mutants with Multiple Point Mutations in the Drug-binding Site and Altered Growth . *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(26):17980-17995.
67. Trotta RF, Brown ML, Terrell JC, et al. Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. 2004;43:4885–9.
68. Ng CL, Siciliano G, Lee MC, de Almeida MJ, Corey VC, Bopp SE, Bertuccini L, Wittlin S, Kasdin RG, Le Bihan A, Clozel M, Winzeler EA, Alano P, Fidock DA. CRISPR-Cas9-modified *pfmdr1* protects *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and gametocytes against a class of piperazine-containing compounds but potentiates artemisinin-based combination therapy partner drugs. *Mol Microbiol*. Agosto de 2016;101(3):381-93.
69. Seebeck T, Sterk GJ, Ke H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future medicinal chemistry*. 2011;3(10):1289-1306.
70. Yuasa K, Mi-Ichi F, Kobayashi T, et al. PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*. 2005;392:221-229.
71. Ramdani G, Naissant B, Thompson E, et al. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. Soldati-Favre D, ed. *PLoS Pathogens*. 2015;11(5):e1004815
72. Howard BL, Harvey KL, Stewart RJ, Azevedo MF, Crabb BS, Jennings IG, Sanders PR, Manallack DT, Thompson PE, Tonkin CJ, Gilson PR. Identification of potent phosphodiesterase inhibitors that demonstrate cyclic nucleotide-dependent functions in apicomplexan parasites. *ACS Chem Biol*. Abril de 2015 17;10(4):1145-54.
73. Collins CR, Hackett F, Strath M, et al. Malaria Parasite cGMP-dependent Protein Kinase Regulates Blood Stage Merozoite Secretory Organelle Discharge and Egress. Sibley LD, ed. *PLoS Pathogens*. 2013;9(5):e1003344.

74. Lanter J, Sui Z, Macielag M, Fiordeliso J, Jiang W, Qiu Y, Bhattacharjee S, Kraft P, John TM, Haynes-Johnson D, Craig E, Clancy J. Structure-activity relationships of N-acyl pyrroloquinolone PDE-5 inhibitors. *J Med Chem.* Janeiro de 2004 29;47(3):656-62.
75. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* Junho de 1987 26;236(4809):1661-6.
76. Oduola AM, Milhous WK, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE. *Plasmodium falciparum*: induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure in vitro. *Exp Parasitol.* Dezembro de 1988;67(2):354-60.
77. Guinet F. A developmental defect in *Plasmodium falciparum* male gametogenesis. *The Journal of Cell Biology.* 1996;135(1):269-278.
78. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* Agosto de 1976 20;193(4254):673-5.
79. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* Junho de 1979;65(3):418-20.
80. Bennett T, Paguio M, Gligorišević B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, Roepe PD. Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1807–1810.
81. Quashie N, Duah N, Abuaku B, Quaye L, Ayanful-Toragby R, Akwoviah G, Kweku M, Johnson J, Lucchi N, Udhayakumar V, Duplessis C, Kronmann K, Koram K. A SYBR Green 1-based *in vitro* test of susceptibility of Ghanaian *Plasmodium falciparum* clinical isolates to a panel of anti-malarial drugs. *Malaria J.* 2013 12:450.
82. Nzila A, Mwai L. In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2010;65(3):390-398.
83. Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R. e Nwaka, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004 3: 509-520.

VII-ANEXOS

ANEXO I

Propriedades dos compostos MS

Sample code	Smile code	Molecular weight	Amount of sample	Volume of DMSO
MS11	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3)N(C(=C4C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	352,42	1.2 mg	681 Microlitre
MS22	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC(OC)C=C3)N(C(=C4C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	382,45	1.0 mg	523
MS24	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3)N(C(=C4C(N)C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	367,44	1.0 mg	544
MS30	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3)N(C(=C4C=CC=C(C)C)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	386,87	1.1 mg	569
MS34	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C3)N(C(=C4C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	442,5	1.0 mg	452
MS39	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3)N(C(OC(C)(C)C)=O)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	362,42	1.0 mg	552
MS52	<chem>O=C1C2=C(C(C(OC)OC)N(C(=C3C=CC=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	350,41	1.0 mg	571
MS61	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3)N(C(=C4C=CC=C(OC)C=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	382,45	1.0 mg	523
MS87	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=C(C)C=C3)N(C(=C4C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	366,45	1.1 mg	600
MS82	<chem>O=C1C2=C(C(C3=CC=CC=C3Br)N(C(=C4C=CC=C4)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	431,32	1.2 mg	556
MS55	<chem>O=C1C2=C(CN(C(=C3C=CC=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	276,33	1.0 mg	723
MS57	<chem>O=C1C2=C(CN(C(=C3C=CC=C(C)C=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	310,78	1.1 mg	708
MS67	<chem>O=C1C2=C(CN(C(=C3C=CC=C(C)C=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	224,25	1.0 mg	892
MS63	<chem>O=C1C2=C(CN(C(=C3C=CC=C(OC)C=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	306,36	1.0 mg	653
MS99	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(OC(C)(C)C)=O)C2)NC3=CC=CC=C31</chem>	286,33	1.1 mg	768
MS75	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(Br)C=C3)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	355,22	1.2 mg	676
MS81	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	366,45	1.0 mg	546
MS88	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	352,43	1.0 mg	567
MS90	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	342,39	1.0 mg	584
MS92	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	370,42	1.0 mg	540
MS94	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C(F)(F)F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	420,43	1.0 mg	476
MS98	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)N=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	356,42	1.0 mg	561
MS101	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)N=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	353,42	1.0 mg	566
MS103	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)N=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	368,43	1.0 mg	543
MS105	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)N=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	366,45	1.1 mg	600
MS114	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	386,87	1.0 mg	517
MS127	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C)C=C3)C2)NC4=CC=C(OC)C=C41</chem>	340,8	1.0 mg	587
MS118	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=NN4C)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	356,42	1.1 mg	617
MS117	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=N5)C5=CC=C4)C=C3)C2)NC6=CC=CC=C61</chem>	403,48	1.0 mg	496
MS111	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C)=O)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	290,31	1.1 mg	758
MS147	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C)=O)C2)NC4=CC=CC=C41</chem>	320,34	1.0 mg	624
MS132	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C2)NC3=CC=CC=C31</chem>	186,21	1.0 mg	108
MS141	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=C(OC)C=C51</chem>	400,44	1.0 mg	499
MS142	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(OC(F)(F)F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	436,43	1.0 mg	458
MS146	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=C(C)C=C51</chem>	404,86	1.0 mg	494
MS176	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	380,43	2.0 mg	1051
MS180	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	370,41	2.2 mg	1187
MS186	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(OC(F)(F)F)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	436,42	2.2 mg	1008
MS181	<chem>O=C1C2=C(C(CN(C(=C3C=CC=C(C(=C4C=CC=C(OC#C)C=C4)C=C3)C2)NC5=CC=CC=C51</chem>	434,48	2.1 mg	966
MS175	<chem>O=C(N1CCOCC1)OC2=C3C(CN(C(=C4C=CC=C(C(=C5C=CC=C(OC(F)(F)F)C=C5)C=C4)C3)=NC6=CC=CC=C62</chem>	549,54	2.0 mg	720

Compostos MS sem atividade biológica

